

УДК 577.218:582.683.2

© O. A. Артеменко, A. F. Попова

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Україна, Київ

ЭКСПРЕССИЯ δ -ЦИКЛИНОВ НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ ЗАРОДЫШЕЙ *BRASSICA RAPA L.* В УСЛОВИЯХ КЛИНОСТАТИРОВАНИЯ

Представлено результати порівняльного вивчення ембріогенезу та експресії генів δ -циклінів у рослин *Brassica rapa* L., які росли в умовах повільного горизонтального клиностатування та лабораторного контролю. Виявлено відставання експресії генів $\delta 1$ -цикліну на ранніх етапах розвитку зародків, сформованих за умов клиностатування, порівняно із лабораторним контролем. Показаний подібний рівень експресії генів $\delta 3$ -цикліну на всіх етапах розвитку зародків (протягом 1-9 діб) в обох варіантах. Деяке запізнення темпів розвитку зародків *Brassica rapa* (1-2 доби) в умовах клиностатування у порівнянні з лабораторним контролем може бути результатом зниження рівня та певного відставання експресії генів $\delta 1$ -цикліну, що виявляється на ранніх етапах формування зародків.

Введение. Условия микрогравитации в определенной мере влияют на развитие зародышей *Brassica rapa*, о чем свидетельствуют результаты космических экспериментов [8, 10]. Сформированные в условиях космического полета зародыши *Brassica*

за составом накопления запасных питательных веществ являются физиологически более молодыми по сравнению с таковыми наземного контроля.

Важность изучения особенностей развития зародышей и их дифференцирования в условиях микро-

гравитации обусловлена необходимостью беспрерывного культивирования высших растений в контролируемых экологических системах жизнеобеспечения, функционирование которых планируется на борту орбитальных станций с увеличением продолжительности космических полетов. Причем именно высшие растения рассматриваются как основные компоненты таких систем благодаря возможности использования их в качестве витаминных и пищевых добавок для космонавтов, а также как регенераторов кислорода в закрытых объемах космических аппаратов.

Полученные в условиях космического полета семена высших однолетних растений по ряду биометрических характеристик отличались от контрольных, в частности размером, весом, количеством и составом запасных веществ, а также лигнина [1, 3, 9], что может быть результатом отклонений в процессе эмбриогенеза. Меньший размер зародышей *Brassica rapa*, сформированных в условиях микрогравитации, по мнению ряда исследователей [9], объясняется уменьшением количества клеток в семядолях, возможно, вследствие ингибирования митоза ядер в этих клетках. Процесс формирования семян изучался также в модельных экспериментах с применением клиностатирования [4], однако эмбриогенез не исследовался, и данных о развитии зародышей в этих условиях нет.

Как известно, циклин-зависимые киназы и циклины являются принципиальными регуляторами эукариотического клеточного цикла. Специфическими для растений являются δ -циклины трех типов ($\delta 1$, $\delta 2$ и $\delta 3$), выделенные из *Arabidopsis thaliana* (L.). Циклин $\delta 1$ отвечает за события, которые происходят в клетке до ее выхода из состояния покоя, $\delta 2$ — за события вступления и выхода из состояния покоя (G0-стадия), $\delta 3$ — за события, которые происходят в клетке после ее выхода из состояния покоя и перехода в фазу синтеза [11]. Поэтому исследования уровня экспрессии генов δ -циклинов, отвечающих за события пресинтетической фазы цикла, важны для выявления эффектов клиностатирования на транскрипционную активность клеток. Здесь мы исследовали особенности протекания раннего эмбриогенеза растений *Brassica rapa* L. и экспрессию $\delta 1$ - и $\delta 3$ -циклинов.

Как свидетельствует опыт экспериментов в условиях космического полета, использование комплекса аналитических методов анализа, эквивалентных запланированным исследованием, как и применение темпоральной фиксации растительного материала, в условиях микрогравитации существенным образом ограничены. Поэтому в своих исследованиях мы использовали клиностатирование, позво-

ляющее воссоздавать эффекты микрогравитации в лабораторных условиях (хотя при этом нельзя избавиться от скалярной составляющей).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

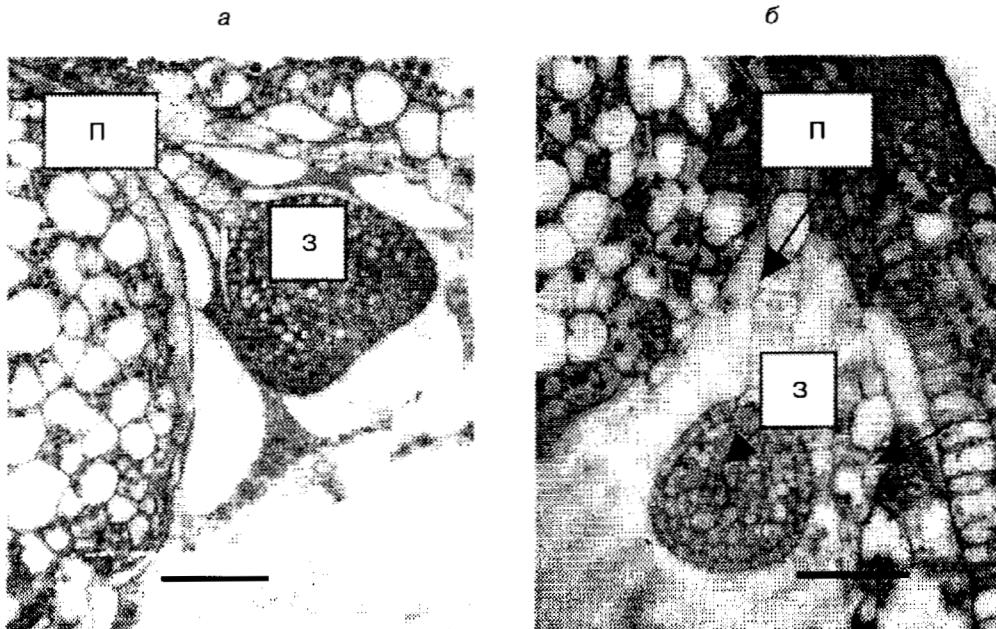
В качестве объекта исследования использовали растения *Brassica rapa* L. (форма Astroplants), с которыми выполнено несколько экспериментов на борту космических аппаратов. Проклюнувшиеся семена помещали в культиваторы, установленные на медленных горизонтальных клиностатах (со скоростью вращения 2 об/мин). Растения выращивали при освещении 220 мкмоль/м²/с. Искусственное опыление цветков проводили специальным приспособлением, приготовленным из брюшка пчелы. Опыленные цветки маркировали цветными нитками, что позволяло четко идентифицировать возраст сформированных зародышей.

Для светооптического исследования зародыши и семяпочки фиксировали смесью 2.5 % раствора глютарового альдегида и 1 % параформальдегида на 0.1 % фосфатном буфере с pH-7.0 с последующим заключением материала в смесь эпона с аралдитом согласно стандартной методике. Для морфологического изучения зародышей срезы окрашивали раствором толуидинового синего, а также проводили реакцию ШИК для выявления полисахаридов [3].

Для изучения экспрессии циклинов осуществляли трансформацию клеток культуры *Esherichia coli* плазмидами pJG8, pBSD2 та pRS1 (производными плазмидами pBluescript Kan⁺), содержащими соответственно циклины $\delta 1$ и $\delta 3$ с целью получения необходимого количества ДНК-зондов. Для поддержания жизнеспособности плазмид pBluescript SK+ культуру *E.coli* DH5 α периодически обновляли и хранили при температуре +4 °C. В качестве среды использовали L-агар.

Фрагменты ДНК, содержащие указанные гены циклинов, выделяли с помощью эндонуклеаз рестрикции Not I, Xba I, Hind III, EcoRI, Bgl II и BamHI и разделяли с помощью стандартного гель-электрофореза в трис-ацетатном буфере (ТАЕ). Зонды метили нерадиоактивной меткой дигоксигенином. Как маркер использовали ДНК фага δ , расщепленную по Hind III [2]. Подобраны и адаптированы методы для выделения РНК и условия для проведения последующей гибридизации согласно [6].

Для определения уровня экспрессии генов δ -циклинов выделяли суммарную РНК из зародышей *Brassica rapa* 3-, 6- и 9-суточного возраста клиностатного и контрольного вариантов. С помощью метода Нозерн-блоттинга выделенную РНК пере-



Трехсуточные зародыши *Brassica rapa* L.: а — контроль, б — клиностатирование; З — зародыш, П — подвесок

носили на нейлоновые мембранные и проводили гибридизацию на фильтрах, Диг-меченных ДНК-зондами циклинов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ сформированных зародышей на ранних стадиях их развития в условиях клиностатирования и в лабораторном контроле показал значительную их подобность. Так, 2-3-суточные зародыши в обоих вариантах имели шаровидную форму и обычно состояли из нитеподобного подвеска, сформированного семью клетками, и собственно зародыша. На поперечных срезах, проходящих через центральную часть зародышей, последние, как правило, состояли из трех рядов клеток. Эпидермальный слой содержал до 13—15 клеток, субэпидермальный — до 9—10 клеток и внутренний — до 3—5 клеток.

В 3—5-суточных зародышах отмечали дифференциацию протодермы, а также начало формирования семядолей в виде небольших бугорков (рисунок а). В 9-суточных зародышах семядоли достигали значительной длины, однако наблюдалась их четкая симметрия, т. е. изгибов семядолей и зародышевого корня в этот период еще не происходило.

В условиях клиностатирования на ранних стадиях формирования зародышей довольно часто отмечали отставание в темпах их развития, обычно на

1-2 сут. Так, если в контрольных зародышах уже появлялись бугорки будущих семядолей, то зародыши клиностатного варианта, как правило, еще имели шаровидную форму (рисунок).

Исследование экспрессии δ -циклинов на разных этапах развития зародышей лабораторного контроля показало, что $\delta 1$ -циклин экспрессируется только на ранних стадиях (в 3-6-суточных зародышах). На более поздних стадиях их формирования (9-суточные зародыши) экспрессии генов $\delta 1$ -циклина уже не было. Экспрессию генов $\delta 1$ -циклина в меристематических клетках молодых листьев *Brassica*, использованных нами как модель для выявления экспрессии δ -циклинов в тканях с активной пролиферацией, наблюдали во все указанные сроки эксперимента.

В клиностатном варианте экспрессия $\delta 1$ -циклина отмечалась с опозданием на 2-3 сут, т. е. обычно на шестые сутки развития зародышей, причем ее уровень был значительно ниже контрольного варианта. На 9-е сутки экспрессия генов $\delta 1$ -циклина в клиностатном варианте слабо выявлялась, а в контроле в этот период ее совсем не было.

Экспрессия генов $\delta 3$ -циклина в зародышах в условиях клиностатирования и в лабораторном контроле всех исследуемых возрастов (1—9 сут) была приблизительно на одном уровне.

Данные о некотором отставании экспрессии генов $\delta 1$ -циклина на ранних этапах развития зародышей

(3–6-суточных) в клиностатном варианте коррелируют с результатами об определенной задержке по сравнению с контролем темпов развития зародышей, о чем свидетельствуют цитоэмбриологические исследования. Полученные нами результаты о более поздних сроках экспрессии генов $\delta 1$ -циклина в зародышах, сформированных в условиях клиностатирования, совпадают с известными литературными данными о том, что экспрессия $\delta 1$ -циклина наблюдается только в начале клеточного цикла (фазы G1-G0) [11]. Отставание экспрессии генов $\delta 1$ -циклина в условиях клиностатирования по сравнению с лабораторным контролем, возможно, связано с ингибированием транскрипционной активности этих генов, что может приводить к блокированию синтеза некоторых белков клеточного цикла. Подобный характер изменений экспрессии генов ряда белков, в частности ингибирование экспрессии генов двух белков цитоскелета, отмечали в условиях клиностатирования [12], а также снижение экспрессии ряда ферментов углеводного обмена в условиях космического полета [7].

Таким образом, некоторое запаздывание темпов развития зародышей *Brassica rapa* в условиях клиностатирования по сравнению с лабораторным контролем, возможно, является следствием отставания экспрессии генов $\delta 1$ -циклина на ранних этапах развития и некоторого снижения уровня их транскрипционной активности.

ВЫВОДЫ

Формирование зародышей на ранних стадиях развития в условиях клиностатирования и в лабораторном контроле осуществляется в основном одинаково, хотя выявлено незначительное отставание в темпах их развития в клиностатном варианте.

Отмечено отставание экспрессии генов $\delta 1$ -циклина на ранних этапах развития зародышей, сформированных в условиях клиностатирования по сравнению с лабораторным контролем, тогда как экспрессия генов $\delta 3$ -циклина наблюдается в зародышах во все исследуемые сроки (1–9 сут) в обеих вариантах.

Некоторое запаздывание в темпах развития зародышей *Brassica rapa* в условиях клиностатирования по сравнению с лабораторным контролем, возможно, является результатом отставания экспрессии генов $\delta 1$ -циклина, что выявляется на ранних эта-

пах формирования зародышей, и некоторого снижения уровня их транскрипционной активности.

- Левинских М. А., Сычев В. Н., Дерендяева Т. А. и др. Анализ влияния космических факторов на рост и развитие суперкарликовой пшеницы в оранжере «Свет» // Авиакосмич. и эколог. мед.—1999.—33.—С. 30—37.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.—479 с.
- Меркис Ф. И., Лауринавичюс Р. С. Полный цикл индивидуального развития растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. на борту орбитальной станции Салют-7 // ДАН СССР.—1983.—271.—С. 509—512.
- Меркис Ф. И., Лауринавичюс Р. С., Рупайнене О. Ю. и др. Рост и развитие растений в условиях, имитирующих невесомость // ДАН СССР.—1976.—226.—С. 978—981.
- Пашева З. П. Основы цитологии растений. — М.: Колос, 1980.—213 с.
- DIG Application Manual for filter hybridization / Ed. Roshe. — Manheim, German., 2002.—222 p.
- Hampp R., Martzivanou M., Mair R.-M., et al. Gravity effects on the *Arabidopsis transcriptome* // Abstr. of 24th Annual Internet. Gravit. Physiol. Meet., 4-9 May, 2003.—P. 68.
- Kuang A., Popova A., Xiao Y., Musgrave M. E. Pollination and embryo development in *Brassica rapa* L. in microgravity // Int. J. Plant Sci.—2000.—161 (2).—P. 203—211.
- Musgrave M. E., Kuang A., Xiao Yi., et al. Gravity-independence of seed-to-seed cycling // Planta.—2000.—210.—P. 400—406.
- Popova A., Musgrave M., Kuang A., Xiao Y., Reserve nutrient substance accumulation in *Brassica rapa* L. seeds in microgravity conditions (STS-87) // J. Gravitat. Physiol.—2002.—9, N 1.—P. 237—238.
- Soni R., Carmichael J. P., Shah Z. H., et al. A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif // The Plant Cell.—1995.—17.—P. 85—103.
- Zhang Shu, Wang Bing, Wu Yan-Hong, et al. Gene expression of paxillin and talin in osteoblasts during weightlessness simulation using clinostat // Abstr. of 24th Annual Internet. Gravit. Physiol. Meet., 4-9 May, 2003.—P. 68.

THE δ -CYCLIN EXPRESSION AT EARLY STAGES OF EMBRYOGENESIS OF *BRASSICA RAPA* L. UNDER CLINOROTATION

O. A. Artemenko, A. F. Popova

We present some results of comparison studying of *Brassica* embryo development and the δ -cyclin genes expression under slow horizontal clinorotation and in the laboratory control. Some backlog of the $\delta 1$ -cyclin genes expression at early stages of embryogenesis under clinorotation was revealed in comparison with the laboratory control. The similar level of the $\delta 3$ -cyclin expression at all stages of embryo formation (from one to nine days) in both variants is shown. Some delays in the rate of *Brassica rapa* embryo development under clinorotation in comparison with the laboratory control can be a result of decrease of a level and some backlog of the $\delta 1$ -cyclin expression at early stages of embryogenesis.